



**« Towards the improvement of the productivity of Rubber-tree »  
Doras Rubber Project**

***Hevea brasiliensis***

**Déterminisme génétique et localisation  
de composantes physiologiques de la productivité  
de l'hévéaculture par approche QTL en Thaïlande.**

**Réalisation d'une carte génétique ancrée sur  
marqueurs microsatellites.**

**André Clément-Demange**

**2001-2003**

**Cirad-Département des Cultures Pérennes  
Programme Hévéa**

## Résumé

Dans le cadre d'un projet de coopération franco-thaïlandais sur la recherche en hévéaculture, une jeune chercheuse thaïlandaise du Rrit-Doa (Rubber Research Institute of Thailand – Department of Agriculture), Ms Kanlaya Prapan, a pu séjourner pendant 12 mois au laboratoire Biotrop du Cirad, du 1<sup>er</sup> décembre 2001 au 30 novembre 2002, pour réaliser la carte génétique d'un croisement de l'espèce *Hevea brasiliensis*, par emploi d'une collection de marqueurs génétiques moléculaires de type microsatellite. Cette recherche a été financée par le deuxième appel à propositions (2001-2003) lancé par AGROPOLIS / Plate-forme de recherches avancées. L'encadrement scientifique a été réalisé par Marc Seguin ; l'appui technique a été réalisé par Maguy Rodier-Goud (Programme Hévéa).

Le croisement RRIM600 x PB217 avait été spécifiquement créé par le Rrit-Doa en Thaïlande, avec pour objectif l'analyse du déterminisme génétique et le positionnement dans le génome de composantes génétiques de caractères physiologiques, architecturaux et technologiques mesurables (incluant croissance et production) et déterminantes pour la classification des clones d'hévéa dans une typologie métabolique existante. La carte génétique a porté sur 334 génotypes descendants des deux parents ; l'étude en champ associée à cette carte porte sur 196 des 334 génotypes cartographiés ; la mise en relation des informations génétiques et phénotypiques permettra une analyse QTL des caractères cibles. Les applications visées portent sur la classification très précoce des clones en cours de sélection à partir de marqueurs génétiques observables dès le stade plantule, soit 4 à 5 ans avant le stade possible des mesures physiologiques, des observations architecturales et des mesures technologiques précoces (approche de sélection assistée par marqueurs). L'étude permettra aussi de tester la mise en complémentarité possible au sein d'un même génotype de types métaboliques opposés. En sus de l'intérêt général de cette recherche, des sorties clonales prometteuses sont attendues du croisement étudié.

Le partenariat franco-thaïlandais, déjà constitué, est un pôle de compétence associant la génétique et l'écophysiologie sur l'hévéa. Il vise d'une part à faire progresser la thématique de recherche choisie (productivité et adaptation écologique de l'hévéaculture) au niveau national de la Thaïlande et au niveau régional de l'Asie du Sud-Est, et d'autre part à constituer un support de formation diplômante pour des étudiants et chercheurs thaïlandais et asiatiques.

A l'issue du travail de Ms Kanlaya Prapan, la carte génétique obtenue doit être complétée par cartographie de 137 marqueurs microsatellites supplémentaires, et saturée par emploi de marqueurs AFLP, ce qui représente encore environ trois mois de travail. Pendant le séjour en France de Ms Kanlaya, 196 descendants cartographiés du croisement ont été multipliés et mis en expérimentation en champ sur une surface de 5 hectares sur la station Rrit-Doa de Chachoengsao, près de Bangkok, en juin 2002. Le suivi expérimental de cet essai, prévu pour 8 ans, a commencé et fait l'objet de rapports semestriels.

## **Mots-clés**

AGROPOLIS – Proposition GENMAP - *Hevea brasiliensis*, population Wickham - Thaïlande (projet Doras-Rubber) - Connaissance et organisation du génome – Utilisation des gènes d'intérêt pour l'amélioration.

Amélioration de la productivité en latex et en bois – Analyse écophysiologique et génétique de la productivité - Carte génétique par déséquilibre de liaison - Marqueurs génétiques moléculaires, microsatellites (SSR) - Etude en champ et analyse QTL - Typologie physiologique des clones et potentiel de production – Typologie architecturale des clones – Qualité technologique du caoutchouc naturel des clones – Sélection précoce - Sélection Assistée par Marqueurs.

## Sommaire

Résumé .....	2
1 Présentation générale du projet .....	1
1.1 L'hévéaculture .....	1
1.2 Le projet Doras-Rubber .....	2
1.3 Le projet GENMAP .....	3
2 Carte génétique du croisement RRIM600 x PB217 Development of a genetic map of RRIM600 x PB217 based on microsatellite markers - Marc Seguin .....	4
2.1 Material and methods .....	4
2.1.1 Plant material .....	4
2.1.2 Sources of microsatellite markers .....	4
2.1.3 Genotyping using radio-labeled PCR products .....	4
2.1.4 Genotyping using fluorescent labelling and electrophoresis in DNA sequencer .....	5
2.1.5 Screening of polymorphic markers .....	7
2.1.6 Data analysis .....	7
2.2 Results .....	7
2.3 Perspective .....	9
2.4 References .....	9
3 Conclusions .....	18
Références .....	19



# 1 Présentation générale du projet

## 1.1 L'hévéaculture

Malgré la concurrence du caoutchouc synthétique, d'autres productions agricoles et d'autres activités économiques, la filière du caoutchouc naturel croît régulièrement au rythme de la croissance économique mondiale. Le caoutchouc naturel, utilisé à 70 % dans l'industrie du pneumatique, représente une production annuelle de 6,8 millions de tonnes et 39 % de l'ensemble des caoutchoucs (naturel + synthétique). La Thaïlande, premier producteur mondial, produit 2,5 millions de tonnes par an. Les 6 premiers producteurs sont en Asie (Thaïlande, Indonésie, Inde, Malaisie, Chine, Viet Nam) : ils représentent 85 % de la production mondiale.

La prédominance des plantations paysannes, déjà élevée (85 %), ne cesse de se renforcer. L'hévéa devient de plus en plus une composante de diversification dans les systèmes de production paysans et s'étend sur des zones géographiques plus variées. En Thaïlande, 90 % de la production est encore concentrée dans la péninsule sud écologiquement la plus favorable où était attirée traditionnellement la main d'œuvre du Nord-Est plus pauvre. Aujourd'hui, le remplacement de l'hévéa par le palmier à huile et le coût des terres dans le Sud conduisent à relocaliser une partie de l'hévéaculture dans le Nord-Est aux conditions écologiques plus difficiles.

Au latex, produit principal récolté pendant plus de 20 ans, s'est ajoutée récemment la valorisation secondaire du bois d'hévéa au moment de l'abattage des parcelles âgées. La réduction massive des surfaces d'hévéa en Malaisie a permis la création d'un marché du bois d'hévéa, ce qui contribue à l'amélioration de la rentabilité des plantations. Le bois de tronc est scié pour la fabrication de meubles, tandis que le bois de branches est transformé en particules. L'architecture des hévéas prend donc une importance nouvelle pour le choix des clones.

La saignée des hévéas est le poste prédominant de consommation de main d'œuvre et donc de coût. La productivité du travail peut être améliorée par la réduction des fréquences de saignée (passage d'une saignée tous les 2 jours à une saignée tous les 3, 4 ou 5 jours, accompagné d'un recours à la stimulation du métabolisme de l'arbre par apport d'éthylène). La capacité d'adaptation des systèmes d'exploitation aux conditions économiques et écologiques dépend considérablement du métabolisme spécifique des clones plantés et de leur flexibilité. Par ailleurs, la saignée a un impact négatif direct sur la croissance des arbres et la formation de biomasse (compétition pour les assimilats). Il faut donc étudier conjointement le fonctionnement du système laticifère, producteur de latex, et celui de l'arbre entier.

<b>La création clonale est donc « tirée » par des considérations écophysiologiques visant à répondre à des exigences économiques.</b>
---

## 1.2 Le projet Doras-Rubber

Le projet « Towards the improvement of the productivity of Rubber-tree » (Doras-Rubber) a fait l'objet, en juin 1998 d'une convention tri-partite passée en Thaïlande entre l'Université de Kasetsart (Ku), le Rubber Research Institute of Thailand – Department of Agriculture (Rrit-Doa) et le Département des Cultures Pérennes du Cirad. Il est prévu sur une durée de 6 ans (1998-2004), avec deux phases de 3 ans. Le séminaire de fin de première phase s'est tenu à Bangkok les 6 et 7 juin 2001. Compte tenu de l'importance de l'écophysiologie dans le projet, un quatrième partenaire, l'Inra-Piaf (Physiologie Intégrative de l'Arbre, Clermont-Ferrand) a rejoint le groupe, avec l'appui du fonds commun Inra-Cirad. Il y a donc 4 partenaires.

Ce projet est réalisé dans le cadre des projets soutenus par l'Ambassade de France à Bangkok et regroupés sous l'égide du Centre DORAS (Development Oriented Research in Agrarian Systems). Le projet s'inscrit également dans le cadre de fonctionnement du COHERAA (Cooperation On Higher Education and Research in Agriculture and Agro-industry), consortium d'universités thaïlandaises coopérant avec des institutions françaises représentées par le Ministère Français de l'Education nationale et par l'Université de Montpellier II.

**Le projet Doras-Rubber vise l'amélioration de la productivité de l'hévéa (principalement latex et secondairement bois) par une association étroite de compétences en génétique et en écophysiologie. La part de progrès recherchée passe par une augmentation de la performance des systèmes de saignée et des clones et par une adaptation de ces deux éléments à la diversité des conditions écologiques et économiques.**

Cette amélioration de la productivité doit permettre le maintien de la rentabilité lorsque le coût de la main d'œuvre augmente, et l'adaptation de la plante introduite en diversification dans les contextes écologiques souvent limitants des plantations paysannes (principalement stress hydrique).

La recherche sur la physiologie de fonctionnement du tissu laticifère (écoulement et régénération, coagulation, stress oxydatif, chargement du laticifère en saccharose), déjà très avancée, est étendue aux relations entre la croissance en biomasse de l'arbre entier et la production antagoniste de latex. Des modèles écophysiologiques de fonctionnement et de prédiction, basés sur les bilans du carbone et de l'eau, sur le stockage et la disponibilité des réserves, sont à élaborer. Leur valeur intégrative correspond au besoin du sélectionneur : ils permettront de comprendre les progrès génétiques déjà acquis et de proposer des critères physiologiques pertinents de sélection. Un diagnostic biochimique comportant 4 caractères mesurables (le « diagnostic latex ») permet déjà de classer les clones dans une typologie métabolique ; ces caractères ont une bonne héritabilité et une variance additive prédominante, leur utilisation en sélection précoce est déjà réalisée à l'âge de 4-5 ans.

Le bois d'hévéa est devenu un nouveau marché qui contribue au maintien de la rentabilité de l'hévéaculture. Pour répondre aux besoins de ce marché, sans nuire à la production principale de latex (caoutchouc naturel), une classification des clones dans une typologie architecturale (importance du tronc, importance des branches) est nécessaire.

### **1.3 Le projet GENMAP**

Le projet GENMAP visait à permettre à un chercheur thaïlandais du Rrit-Doa (candidat GENMAP) de réaliser efficacement, au laboratoire Biotrop du Cirad AGROPOLIS à Montpellier, la partie « cartographie génétique » d'une approche génétique des composantes physiologiques de la productivité, avec l'encadrement et l'expertise du Programme Hevea du Cirad. L'étude en champ de ces composantes et l'analyse QTL seront réalisées en Thaïlande avec l'appui du Cirad. Cette démarche est centrée sur des caractères physiologiques du fonctionnement du laticifère, mais devraient également intégrer des caractères architecturaux (valorisation du bois d'hévéa) ainsi que des caractères de qualité technologique du caoutchouc produit.

Le choix de marqueurs microsatellites (SSR) est déterminé par la richesse de leur polymorphisme, par la possibilité de transférer aisément la technique PCR associée et par la possibilité de réaliser, avec ces marqueurs, des génotypages sur de grands effectifs. Les SSR disponibles ont été obtenus par le Cirad avec la participation du Centre National français de Séquençage (CNS, Génoscope). Ils sont utilisés en routine au laboratoire Biotrop du Cirad.

Le Rrit-Doa, non encore équipé, souhaite pouvoir utiliser à terme de façon autonome une unité de marquage génétique en PCR ciblée, associée au programme d'amélioration génétique de l'hévéa, pour pratiquer des contrôles de conformité clonale (recherche et assurance-qualité pour le développement), des contrôles de légitimité des croisements réalisés en pollinisation manuelle, des tests de paternité dans les vergers à graines fonctionnant en pollinisation naturelle, des cartographies appliquées à différents objectifs de sélection. A l'issue de son séjour à AGROPOLIS, et avec l'appui de l'Université de Kasetsart, le candidat GENMAP pourra participer au montage et au fonctionnement de cette unité d'analyse PCR/SSR.

Dans le cadre du projet « Doras-Rubber », l'Université de Kasetsart développe des recherches orientées sur l'étude des gènes exprimés (EST, approche « gènes candidats ») tandis que le Cirad contribue au développement des applications permises par les marqueurs génétiques moléculaires « neutres » basés sur la méthodologie PCR, et principalement les marqueurs microsatellites qu'il a mis au point. Dans le prolongement de GENMAP, l'université de Kasetsart supervisera, avec l'appui du Cirad, un projet de Ph.D. portant sur l'analyse QTL des composantes physiologiques et technologiques de la productivité.

## **2 Carte génétique du croisement RRIM600 x PB217 Development of a genetic map of RRIM600 x PB217 based on microsatellite markers - Marc Seguin**

This report provides updated results on microsatellite genome mapping carried out by Ms Kanlaya Prapan at Cirad-Montpellier (December 2001-December 2002). After the departure of Kanlaya, Cirad team finalized some steps of the mapping work performed in 2002 : 1) finalization of primer pairs screening and 2) complete data analysis for mapping. During Kanlaya's course, the map construction performed was only a rapid and preliminary analysis. In addition, the number of usable microsatellite sequences being insufficient for a satisfying genome coverage, 100 more DNA sequences were obtained, under an additional grant from Cirad.

### **2.1 Material and methods**

#### **2.1.1 Plant material**

The segregating population RRIM600 x PB217, used for genetic mapping experiments, was created by RRIT (CRRC, Thailand) and encompasses 335 progenies. The legitimacy of all these individuals has been previously confirmed by paternity testing using 10 microsatellite markers. Nevertheless, a mislabelling problem led to the wrong identification of one of the 335 progenies. This appeared during progress of additional microsatellite genotyping. The rogue individual (id = 216 = AA115-5) was discarded for data scoring. The genetic map was thus established on 334 progenies (table 1), with few missing data.

#### **2.1.2 Sources of microsatellite markers**

The microsatellite markers and sequences were obtained by Cirad from 3 different sources (Seguin et al. 2001):

- 1- Markers from the previously Cirad published map (Lespinasse et al. 2000) ; these markers were issued from a PstI genomic library (Besse et al. 1994; Seguin et al. 1997);
- 2- Sequences obtained by Cirad under a grant from Genoscope/CNS (Evry) in 1999;
- 3- Sequences obtained by Cirad under a second grant from Genoscope/CNS (Evry) in 2000.

The genomic DNA clones sequenced at Genoscope/CNS were selected from 3 microsatellite enriched libraries created by Cirad in Montpellier (Gay 1998; Seguin et al. 2001; Xiong 2000).

#### **2.1.3 Genotyping using radio-labeled PCR products**

This protocol was applied for genotyping of the progenies with the microsatellite primers designed from sequences issued from the Génoscope/CNS 1999 project. It was also applied for the microsatellite markers previously mapped on the Cirad reference map.



- Radio-labeled PCR products were obtained by labelling forward primers with [ $\gamma^{33}\text{P}$ ]ATP using a T4 polynucleotide kinase.
- PCR reactions were carried out in a 25  $\mu\text{l}$  volume containing 100 ng of genomic DNA, 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer, 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, and 1.5 U of Taq DNA polymerase in 1X reaction buffer (20 $\mu\text{M}$  Tris HCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ).
- PCR amplifications were performed in PTC 100<sup>TM</sup> (MJ Research, Inc.) using the following cycles: 5 min at 95°C, then followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 45 sec at 48, 50 or 55°C, 1 min at 68, 70 or 72°C, with the final step of 5 min at 68, 70 or 72°C. Samples were prepared for polyacrylamide gel electrophoresis by adding 20  $\mu\text{l}$  of formamide dye (containing 10 mM NaOH; 0.05% Bromophenol, 0.05 Xylenecyanol, 12.5% (P/V) Saccharose and 95% formamide). The amplification products were detected on 5% denaturing polyacrylamide gels (33 cm width of nucleic acid sequencer Model DDH-402-33) in 0.5XTBE buffer at 55 W constant power. The gels were dried and then exposed to X-ray film for 3-4 days.

#### 2.1.4 Genotyping using fluorescent labelling and electrophoresis in DNA sequencer

IR-fluorescent PCR reactions were performed using the following strategy :

- One of the PCR primers had a 19 base extension at its 5' end with the sequence 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'. This sequence is identical to an IR-labelled universal M13 Forward (29-mer) primer, which is included in the reaction.
- During the PCR, the tailed primer generates a complementary sequence to the M13 primer which is subsequently utilised for priming in the amplification reaction thereby generating IR-labelled PCR products.
- All PCR were produced in 10  $\mu\text{l}$  containing 20 ng of DNA, 1  $\mu\text{l}$  10X PCR buffer (200 mM Tris-HCL (pH 8.4), 500 mM KCl), 200 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 0.05 mM of each the M13-tailed primer, 0.1  $\mu\text{M}$  of the other primer, 0.1  $\mu\text{M}$  of the IR-labelled (either with IR700 or IR800) M13 primer and 1U of Taq DNA Polymerase (Eurobio). Primers were synthesised by Eurogentec (France) and the IR-labelled M13 primer by Biolegio (The Netherlands).
- Cycling conditions consisted of an initial denaturing step of 4 min at 94°C, followed by 35 cycles consisting of 45s at 94°C, 45s at 50°C, and 45s at 72°C, and a final elongation step at 72°C for 10 min.
- All PCR reactions were performed on a PTC 200 MJResearch thermocycler. Gel electrophoresis and visualisation of the microsatellite alleles were accomplished using a LI-COR IR2 Model 4200 automated DNA sequencer (LI-COR, Inc., Lincoln, NE). Gels were 18 cm in length, 0.25 mm in thickness and composed of 6.5% KB+ acrylamide, 7M urea (LI-COR).
- Runs were performed in 1X TBE buffer, at 48°C and 40 W constant. A standard size ladder obtained from amplification of known band sizes was loaded regularly. The raw data depicting the microsatellite alleles is displayed as an auto-radiogram like image on the computer and analyzed as it.

**Table 1** : List of the 335 RRIM600 x PB217 legitimate progenies used for microsatellite genotyping. Individual 216+AA115/5 appeared to be illegitimate during mapping experiments and was discarded for linkage analyses.

1	AA68/2	51	AA78/6	101	AA90/4	151	AA103/2	201	AA112/5	251	AA122/4	301	AA133/6
2	AA68/4	52	AA78/8	102	AA90/5	152	AA103/3	202	AA112/6	252	AA122/5	302	AA133/7
3	AA68/5	53	AA78/9	103	AA90/6	153	AA103/4	203	AA112/8	253	AA122/7	303	AA133/9
4	AA68/7	54	AA78/10	104	AA90/7	154	AA103/5	204	AA112/9	254	AA122/8	304	AA134/4
5	AA68/9	55	AA79/3	105	AA91/2	155	AA103/7	205	AA113/2	255	AA122/9	305	AA134/5
6	AA68/10	56	AA79/5	106	AA91/4	156	AA104/4	206	AA113/3	256	AA123/3	306	AA134/6
7	AA69/3	57	AA79/6	107	AA91/7	157	AA104/6	207	AA113/5	257	AA123/4	307	AA134/7
8	AA69/4	58	AA79/7	108	AA91/9	158	AA104/7	208	AA113/8	258	AA123/6	308	AA134/8
9	AA69/6	59	AA79/8	109	AA92/4	159	AA104/9	209	AA113/10	259	AA123/8	309	AA134/9
10	AA69/8	60	AA79/9	110	AA92/5	160	AA104/10	210	AA114/4	260	AA123/9	310	AA134/10
11	AA69/9	61	AA80/4	111	AA92/7	161	AA105/2	211	AA114/7	261	AA123/10	311	AA135/2
12	AA70/3	62	AA80/5	112	AA92/10	162	AA105/3	212	AA114/8	262	AA124/3	312	AA135/3
13	AA70/4	63	AA80/6	113	AA93/2	163	AA105/4	213	AA114/10	263	AA124/5	313	AA135/4
14	AA70/5	64	AA80/7	114	AA93/4	164	AA105/6	214	AA115/3	264	AA124/8	314	AA135/7
15	AA70/7	65	AA80/8	115	AA93/8	165	AA105/8	215	AA115/4	265	AA124/9	315	AA135/8
16	AA70/9	66	AA80/10	116	AA93/10	166	AA105/9	216	AA115/5	266	AA124/10	316	AA136/3
17	AA71/2	67	AA81/3	117	AA94/2	167	AA105/10	217	AA115/10	267	AA125/2	317	AA136/5
18	AA71/3	68	AA81/5	118	AA94/5	168	AA106/2	218	AA116/3	268	AA125/5	318	AA136/6
19	AA71/4	69	AA81/6	119	AA94/6	169	AA106/3	219	AA116/5	269	AA125/6	319	AA136/7
20	AA71/5	70	AA81/7	120	AA94/7	170	AA106/4	220	AA116/6	270	AA125/8	320	AA136/9
21	AA71/7	71	AA81/8	121	AA94/9	171	AA106/5	221	AA116/7	271	AA125/9	321	AA136/10
22	AA71/8	72	AA81/9	122	AA95/8	172	AA106/8	222	AA116/8	272	AA126/9	322	AA137/2
23	AA71/9	73	AA82/6	123	AA95/9	173	AA106/10	223	AA116/9	273	AA126/10	323	AA137/3
24	AA72/3	74	AA82/7	124	AA95/10	174	AA107/6	224	AA117/2	274	AA127/4	324	AA137/4
25	AA72/4	75	AA82/8	125	AA96/3	175	AA107/7	225	AA117/3	275	AA127/5	325	AA137/6
26	AA72/6	76	AA82/10	126	AA97/4	176	AA107/8	226	AA117/4	276	AA127/6	326	AA137/7
27	AA72/9	77	AA83/2	127	AA97/5	177	AA107/9	227	AA117/5	277	AA127/10	327	AA137/9
28	AA72/10	78	AA83/4	128	AA97/6	178	AA108/4	228	AA117/6	278	AA128/3	328	AA137/10
29	AA73/2	79	AA83/7	129	AA98/4	179	AA108/7	229	AA117/7	279	AA128/6	329	AA138/5
30	AA73/4	80	AA83/9	130	AA98/7	180	AA108/10	230	AA117/8	280	AA128/7	330	AA138/7
31	AA73/7	81	AA83/10	131	AA98/8	181	AA109/3	231	AA117/9	281	AA128/9	331	AA139/8
32	AA73/8	82	AA84/3	132	AA98/9	182	AA109/5	232	AA117/10	282	AA129/5	332	AA140/5
33	AA74/5	83	AA84/4	133	AA98/10	183	AA109/6	233	AA118/2	283	AA129/8	333	AA140/10
34	AA74/7	84	AA84/6	134	AA99/2	184	AA109/9	234	AA118/4	284	AA129/9	334	AA141/9
35	AA75/3	85	AA84/9	135	AA99/5	185	AA109/10	235	AA118/5	285	AA130/2	335	AA141/10
36	AA75/4	86	AA85/2	136	AA99/7	186	AA110/3	236	AA118/8	286	AA130/4		
37	AA75/7	87	AA85/3	137	AA99/10	187	AA110/4	237	AA118/10	287	AA130/5		
38	AA75/8	88	AA85/4	138	AA100/5	188	AA110/5	238	AA119/3	288	AA130/6		
39	AA75/9	89	AA85/5	139	AA100/6	189	AA110/6	239	AA119/4	289	AA130/10		
40	AA76/2	90	AA85/6	140	AA100/7	190	AA110/7	240	AA119/5	290	AA131/2		
41	AA76/4	91	AA86/4	141	AA100/10	191	AA110/8	241	AA119/7	291	AA131/5		
42	AA76/5	92	AA86/8	142	AA101/2	192	AA110/9	242	AA119/8	292	AA131/6		
43	AA76/6	93	AA86/9	143	AA101/5	193	AA110/10	243	AA120/2	293	AA131/7		
44	AA76/7	94	AA86/10	144	AA101/6	194	AA111/3	244	AA120/3	294	AA131/8		
45	AA76/8	95	AA87/4	145	AA102/2	195	AA111/4	245	AA120/5	295	AA131/10		
46	AA76/10	96	AA87/10	146	AA102/4	196	AA111/7	246	AA120/9	296	AA132/4		
47	AA77/7	97	AA88/3	147	AA102/5	197	AA111/8	247	AA120/10	297	AA132/6		
48	AA77/9	98	AA88/4	148	AA102/7	198	AA111/9	248	AA121/5	298	AA132/8		
49	AA77/10	99	AA88/5	149	AA102/9	199	AA112/2	249	AA121/9	299	AA132/10		
50	AA78/4	100	AA88/10	150	AA102/10	200	AA112/3	250	AA122/3	300	AA133/3		

### 2.1.5 Screening of polymorphic markers

Before genotyping on the complete progeny, all primer pairs were screened for PCR amplification efficiency and for genetic polymorphism were tested on a small sample of accessions: the 2 parents (RRIM600 and PB217) and the 3 available grandparents (PB49, PB86 and TJ1).

### 2.1.6 Data analysis

For some of the markers genotyped on the LiCOR sequencer, segregation data were scored using automated detection from fluorescent pattern using SAGA software. But, for most of the markers, including all the ones genotyped by radio-labeling methods, data scoring was performed "manually".

Data were scored as 0/1 digit for presence absence of the segregating bands in each progeny, and transformed in data file format for JoinMap V3 mapping software using the CP option. CP option allows linkage analysis for loci heterozygous either in only one parent (2 alleles abxaa or aaxab configurations) or in the 2 parents (4 alleles abxcd, 3 alleles abxac or 2 alleles - codominant or dominant - abxab configurations). In addition to the consensus map built from all segregating markers, the 2 parental maps were also built using segregation data for markers heterozygous in each parent respectively (pseudo-test cross analyses).

The comparison of marker orders in the two parental maps allows to control that each microsatellite markers reveals identical locus, with no great distortion, in the 2 parental genotypes. Markers revealing same locus in the 2 parents is then used as a bridge locus between the 2 maps for consensus CP map establishment. In case of disagreement in map location between the 2 parents, the segregating data from one of the 2 parents were discarded, based on quality parameters (number of missing data, segregation distortion from the expected ratio: 1:1, 3:1 or 1:2:1, or in case of dominance in only one parent).

Linkage tests were performed at a LOD threshold of 3.0. Loci orders were established at LOD = 3.0 with  $\theta = 48\%$  of recombination and min-LOD threshold = 0.1. Two additional criteria were used to identify linked markers with uncertain map location: Chi2 contribution and goodness of fit which estimate the quality of map position of individual markers.

## 2.2 Results

The mapping results are summarized in table 2 and 3, for the 3 maps established from segregating data in the RRIM600 x PB217 progeny. The detailed lists of mapped markers are given in table 4, 5 and 6. Map drawings are given in figure 1, 2 and 3.

The current consensus (CP) map encompasses 139 microsatellite markers clustered in 15 linkage groups. Eleven of these groups were assigned to reference linkage group (Lespinasse et al. 2000) thanks to loci in common with the published map. The consensus map length (table 3) represents about 50% of the total *Hevea* genome



length, and of expected number of linkage group is 18 in this species. Nevertheless, only half of the polymorphic markers were genotyped on the complete progeny and mapped (table 2). This suggests that a nearly saturated map could be reached, by achieving genetic mapping of all the 276 polymorphic markers in this RRIM600 x PB217 progeny.

**Table 2 :** Summarized results of microsatellite mapping on the RRIM600 x PB217 progeny. Number of markers are given according to the genomic library source.

<b>Microsatellite source</b>	<b>Reference map</b>	<b>CNS 1999</b>	<b>CNS 2000</b>	<b>Total</b>
Screened for polymorphism	36	138	261	435
Polymorphic between parents	27	76	173	<b>276</b>
Mapped	17	74	48	<b>139</b>
Remaining to be mapped	10	2	125	<b>137</b>

**Table 3 :** Synthetic results of microsatellite genetic mapping in the RRIM600 x PB217 progeny, for the two parental maps and for the CP consensus map. The CP map was built by merging the parental maps using CP option of JoinMap3 software. Map length is equal to the sum of linkage groups.

	<b>RRIM600</b>	<b>PB217</b>	<b>RRIM600xPB217 (CP)</b>
Number of segregating markers	107	103	139
Number of unlinked markers	3	7	5
Number of linkage groups	14	13	15
Number of assigned linkage groups	10	9	11
Map length	1220	1190	1380

## 2.3 Perspective

This work must be completed and achieved by :

- 1- mapping the remaining 137 microsatellite markers,
- 2- complete map saturation using AFLP technique,
- 3- mapping more bridge markers on the Cirad PB260 x RO 38 reference map.

Due to limited funding and restricted access to leaf samples from RRIT-Thailand, the points 1 and 2 have to be realized by a supplementary course of a RRIT researcher in Biotrop laboratory of Cirad-Montpellier. The point n° 3 will be partly realized by Cirad team (M. Seguin and M. Rodier-Goud) in the frame of other genome mapping and linkage disequilibrium projects.

## 2.4 References

- Besse P, Seguin M, Lebrun P, Chevallier MH, Nicolas D, Lanaud C (1994) Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 88:199-207.
- Gay C (1998) Développement de marqueurs microsatellites pour l'analyse du génome de deux plantes tropicales, la canne à sucre et l'hévéa Productivité Végétale. Université Paris VII, Paris, France, p 36.
- Lepinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, Seguin M (2000) A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100:127-138.
- Seguin M, Adunsadthapong S, Rodier-Goud M, Teeratanasuk K (2001) Identification of additional microsatellite markers for PCR based genome mapping in rubber tree Rubber Seminar. Cirad/KU/RRIT, Bangkok, Thailand in press.
- Seguin M, Rodier-Goud M, Lepinasse D (1997) Mapping SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) facilitated and enhanced by heteroduplex formation and template mixing. In: Bigwood D, Gale M, Miksche J, McCouch S (eds) *Plant & Animal Genome V*. Scherago International, New York, USA, 12-16 January 1997, San Diego, Californie, USA Poster n° 61: Abstract p.66.
- Xiong T-C (2000) Développement des marqueurs microsatellites pour l'analyse du génome de l'hévéa et du champignon pathogène *Microcyclus ulei*. Université Montpellier II, Montpellier, France, p 41.

**Table 4** : List of the bridge markers, i.e. mapped on the RRIM600 x PB217 progeny and present in the published map, allowing assignment to the reference linkage group (from Lespinasse et al. 2000)

<b>no.</b>	<b>Primer</b>	<b>Product size (bp)</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Annealing temp/ extension temp</b>
1	M574	238	69-2	70-2	50/70
2	MT65	196	175	176	50/70
3	MnSOD	200	5	6	55/72
4	MA66	275	195	196	55/72
5	M124	166	25-2	26-2	50/70
6	MA31	154	193	194	50/70
7	MT67	120	185	186	50/70
8	M256	258	123	124	55/72
9	M338	272	9	10	55/72
10	M412	258	51-2	52-2	50/70
11	Hmg1	272	1	2	55/72
12	M72	192	19	20	55/72
13	M127	292	29	30	55/72
14	M214	242	119	120	55/72
15	M264	228	125	126	50/70
16	M291	196	41-2	42-2	48/68
17	M340	304	21-2	22-2	50/70
18	M415-460	185	217	218	50/70
19	M508	262	73	74	48/68

**Table 5** : List and characteristics of the 74 microsatellite markers mapped in the RRIM600 x PB217 progeny, using [ $\gamma$ 33 P]-ATP labeling protocol. The corresponding DNA sequences were obtained from the CNS 1999 / Cirad project.

no.	Marker name	Product size (bp)	Forward primer AGHE#	Reverse primer AGHE#	Annealing temp/ extension temp
1	t1067	260	377	378	52/72
2	t150	141	239	240	50/70
3	t152	163	257	258	50/70
4	t319	188	269	270	50/70
5	t595	251	291	292	50/70
6	t601	206	293	294	52/72
7	t615	230	295	296	50/70
8	t686	227	297	298	52/72
9	t728	228	301	302	50/70
10	t730	203	303	304	50/70
11	a036	264	243	244	50/70
12	a053	238	245	246	50/70
13	a058	174	247	248	52/72
14	a073	155	273	274	52/72
15	a078	183	251	252	52/72
16	a087	170	255	256	55/72
17	a090	228	275	276	52/72
18	a105	176	281	282	50/70
19	a107	147	283	284	55/72
20	a120	131	307	308	52/72
21	a123	309	310	195	55/72
22	a129	277	313	314	52/72
23	a131	185	315	316	52/72
24	a134	173	317	318	50/70
25	a135	237	319	320	52/72
26	a137	190	321	322	50/70
27	a144	152	327	328	55/72
28	a148	274	329	330	50/70
29	a156	244	333	334	52/72
30	a169	269	339	340	52/72
31	a170	259	341	342	52/72
32	a173	163	343	344	52/72
33	a174	126	345	346	52/72
34	a179	178	349	350	50/70
35	a188	222	353	354	52/72
36	a214	156	363	364	50/70
37	a215	289	365	366	50/70
38	a220	177	369	370	52/72
39	a235	280	387	388	52/72
40	a241	162	395	396	52/72
41	a245	111	397	398	50/70
42	a248	265	399	400	52/72
43	a251	205	401	402	52/72
44	a262	253	405	406	52/72
45	a268	242	411	412	52/72
46	a274	236	415	416	50/70
47	a275	178	417	418	52/72
48	a278	200	419	420	50/70
49	a282	101	421	422	52/72
50	a283	174	423	424	52/72
51	a286	178	425	426	52/72
52	a288	231	427	428	50/70
53	a289	173	429	430	52/72
54	a295	280	433	434	50/70

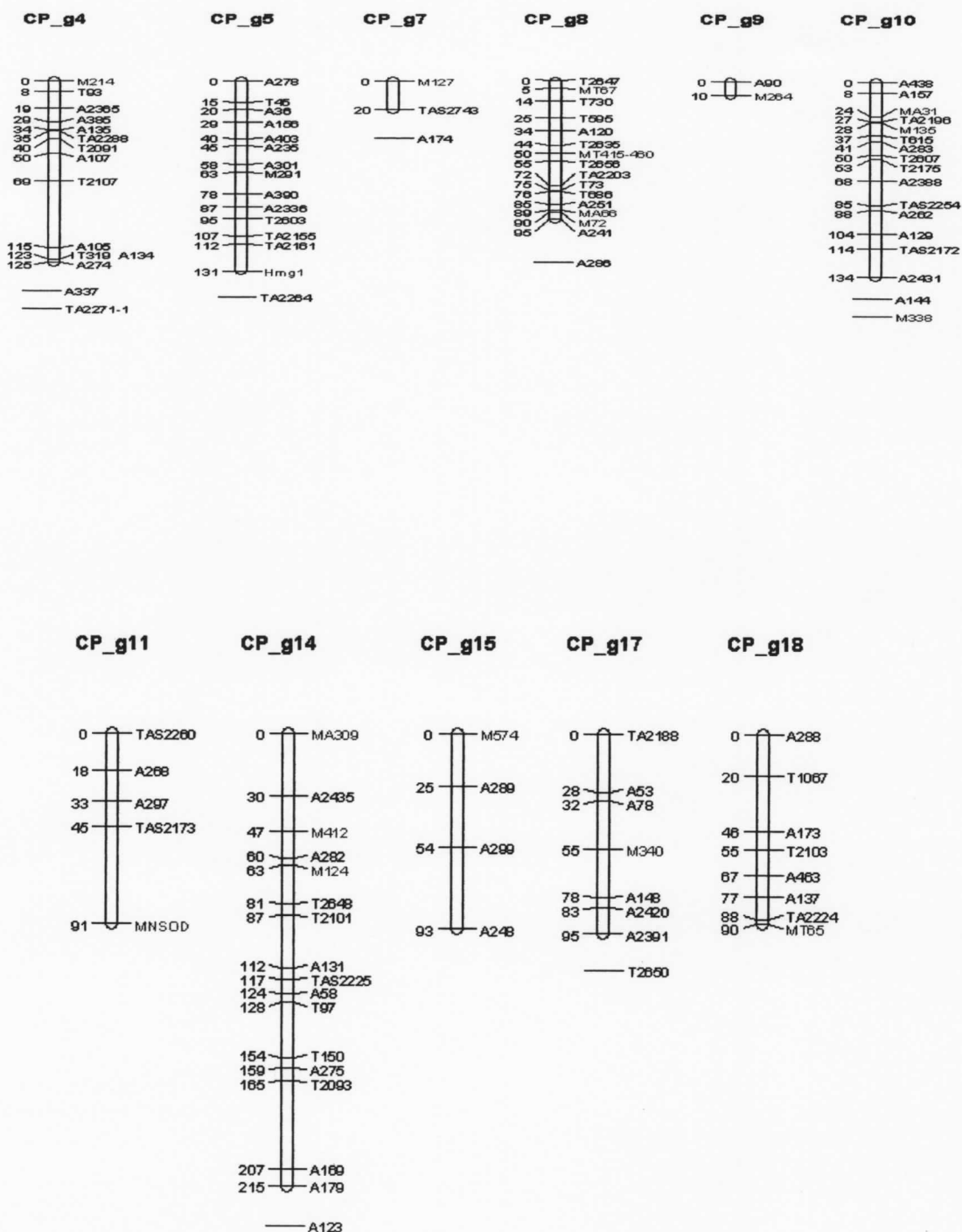
Table 5 (continued)

N °	Primer	Product size (bp)	Forward	Reverse	Annealing temp / Extension temp.
55	a296	147	435	436	50/70
56	a297	209	437	438	52/72
57	a299	132	439	440	50/70
58	a301	282	441	442	50/70
59	a304	226	445	446	52/72
60	a337	123	449	450	50/70
61	a344	215	451	452	52/72
62	a365	219	461	462	52/72
63	a385	115	467	468	50/70
64	a390	230	469	470	55/74
65	a394	211	471	472	52/72
66	a403	161	475	476	52/72
67	a438	250	481	482	52/72
68	a451	275	483	484	52/72
69	a460	116	487	488	52/72
70	a463	196	489	490	52/72
71	t045	238	225	226	52/72
72	t073	143	231	232	50/70
73	t093	136	233	234	50/70
74	t097	158	235	236	50/70

**Table 6 :** List and characteristic of the 48 microsatellite markers mapped in the RRIM600 x PB217 progeny, using fluorescent labeling in DNA sequencer protocol. The corresponding DNA sequences were obtained from the CNS 2000 / Cirad project.

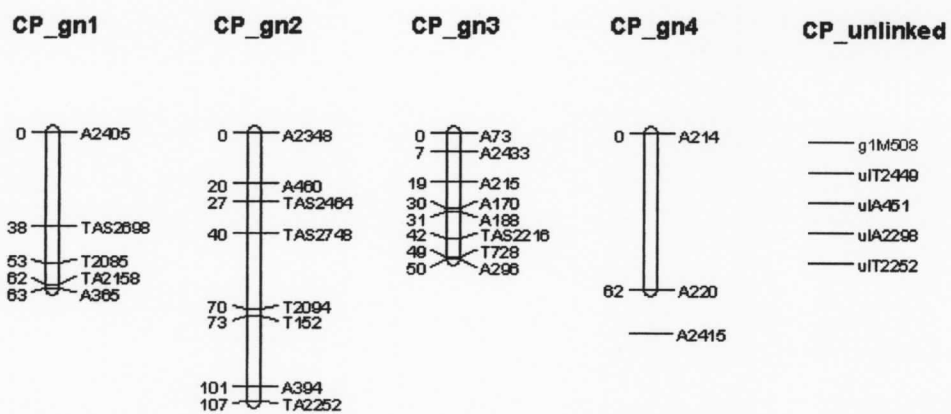
No.	microsatellite	primer 1	primer 2	product size	No.	microsatellite	primer 1	primer 2	product size
1	A2298	Hb685	Hb686	264+19	28	T2635	Hb793	Hb794	315+19
2	A2336	Hb691	Hb692	90+19	29	T2647	Hb809	Hb810	221+19
3	A2348	Hb693	Hb694	322+19	30	T2648	Hb811	Hb812	295+19
4	A2388	Hb703	Hb704	127+19	31	T2650	Hb815	Hb816	246+19
5	A2391	Hb707	Hb708	267+19	32	T2656	Hb817	Hb818	148+19
6	TAs2743	Hb925	Hb926	113+19	33	TA2155	Hb857	Hb858	283+19
7	TAs2748	Hb929	Hb930	196+19	34	TA2158	Hb579	Hb580	298+19
8	A2405	Hb949	Hb950	173+19	35	TA2161	Hb581	Hb582	122+19
9	A2415	Hb963	Hb964	264+19	36	TA2172	Hb587	Hb588	112+19
10	A2420	Hb969	Hb970	206+19	37	TA2175	Hb589	Hb590	201+19
11	A2431	Hb987	Hb988	257+19	38	TA2188	Hb595	Hb596	145+19
12	A2433	Hb721	Hb722	102+19	39	TA2196	Hb607	Hb608	116+19
13	A2435	Hb991	Hb992	243+19	40	TA2203	Hb613	Hb614	216+19
14	TAs2216	Hb873	Hb874	162+19	41	TA2224	Hb629	Hb630	200+19
15	TAs2260	Hb887	Hb888	182+19	42	TA2225	Hb631	Hb632	181+19
16	TAs2464	Hb841	Hb842	213+19	43	TA2252	Hb653	Hb654	233+19
17	TAs2698	Hb915	Hb916	315+19	44	TAs2254	Hb885	Hb886	183+19
18	T2085	Hb849	Hb850	184+19	45	TA2264	Hb661	Hb662	121+19
19	T2091	Hb853	Hb854	277+19	46	TA2271	Hb665	Hb666	216+19
20	T2093	Hb547	Hb548	259+19	47	TA2288	Hb681	Hb682	225+19
21	T2094	Hb549	Hb550	313+19	48	TAs2173	Hb859	Hb860	186+19
22	T2101	Hb555	Hb556	138+19					
23	T2103	Hb557	Hb558	108+19					
24	T2107	Hb855	Hb856	95+19					
25	T2449	Hb729	Hb730	106+19					
26	T2603	Hb753	Hb754	293+19					
27	T2607	Hb757	Hb758	70+19					

**Figure 1** : Consensus map built on RRIM600 x PB217 progeny using CP option in JoinMap3. Bridge markers with the Cirad reference map, i.e. those mapped in the PB260 x RO38 published map are in grey colour. Markers drawn outside the corresponding linkage group are linked markers with imprecise map location.

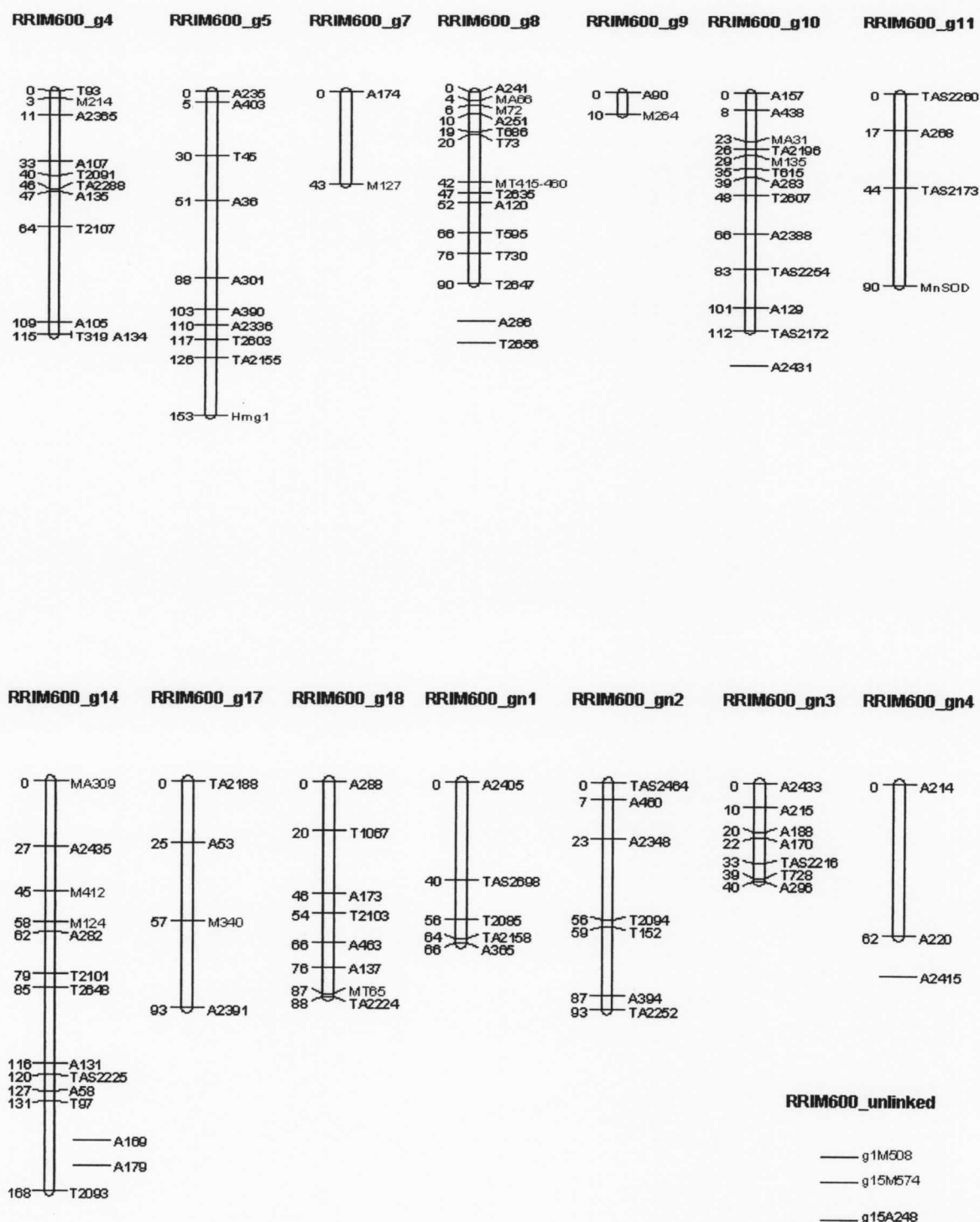




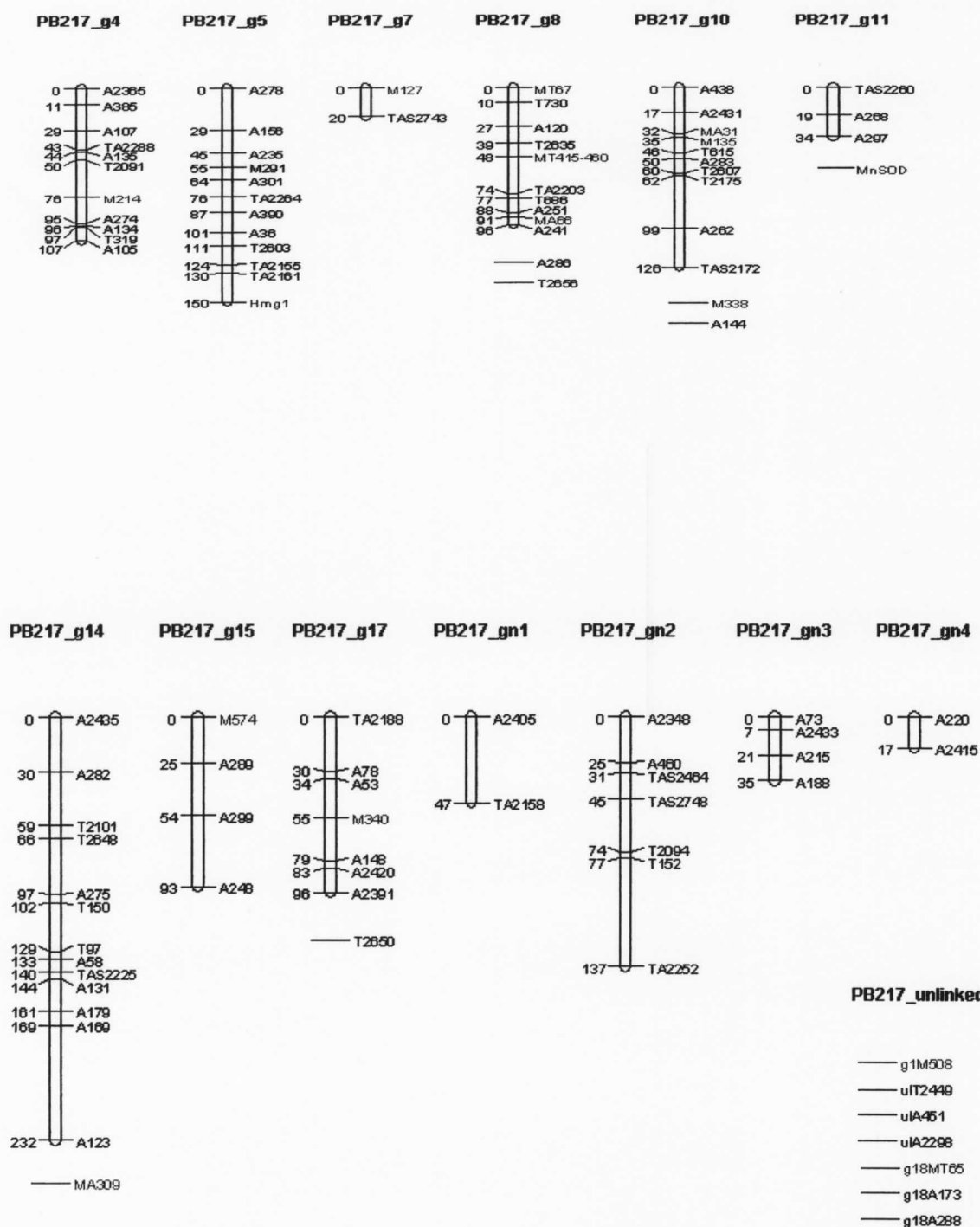
(Figure 1 continued)



**Figure 2** : Parental map built on RRIM600 (female parent) using only markers heterozygous in RRIM600. Bridge markers with the PB260 x RO38 published map are in grey colour. Markers drawn outside the corresponding linkage group are linked markers with imprecise map location.



**Figure 3** : Parental map built on PB217 (male parent) using only markers heterozygous in PB217. Bridge markers with the Bridge markers with the PB260 x RO38 published map are in grey colour. Markers drawn outside the corresponding linkage group are linked markers with imprecise map location.



### 3 Conclusions

Le séjour de 12 mois de Ms Kanlaya Prapan lui a permis de réaliser en un temps court la plus grande partie du travail de cartographie génétique du croisement RRIM600 x PB217 réalisé en Thaïlande pour l'étude du déterminisme physiologique de différents caractères associés au processus de production de l'hévéaculture.

Un nombre de 334 descendants vérifiés légitimes de ce croisement a été utilisé pour la cartographie génétique. La carte consensus obtenue comprend actuellement 139 marqueurs microsatellites cartographiés regroupés en 15 groupes de linkage, contre 18 attendus par référence au nombre  $n = 18$  du génome haploïde du genre *Hevea*. 11 de ces groupes ont pu être associés aux groupes correspondants de la première carte génétique réalisée sur hévéa avec des marqueurs RFLP (Lespinasse et al., 2000). Compte tenu des mises au point méthodologiques réalisées au cours du séjour de Ms Kanlaya, la poursuite de la cartographie de 137 marqueurs microsatellites encore disponibles et la saturation finale par des marqueurs AFLP pourra être réalisée par un travail complémentaire d'environ 3 mois dont le financement est à rechercher. On disposera alors de l'outil indispensable permettant de rechercher des Qtls associés aux divers caractères d'intérêt étudiés en champ.

Un essai « Genmap » d'une surface de 5 hectares a en effet été installé en champ en juin 2002 sur la station Rrit-Doa de Chachoengsao, près de Bangkok, avec un programme de mesures expérimentales prévu pour 8 ans (2002-2010). Cet essai, réalisé selon un dispositif de type « alpha-plan » adapté au grand nombre de génotypes présents (200 génotypes) pour le contrôle de la variation due à l'environnement, fait d'ores et déjà l'objet d'un suivi de croissance et d'une description architecturale dont les résultats sont consignés dans des rapports de recherche semestriels. Ces données et leur mise en relation avec la carte génétique, devraient faire l'objet d'un sujet de thèse de Ph.D. à traiter par Ms Kanlaya ou par un autre chercheur thaïlandais.

## Références

- Clément-Demange, A. (2002). Doras-Rubber / Genmap component. Two missions in Thailand in 2002. 10-28 June / 30 November - 14 December, 2002. Field trial planting, measurements and analysis. Cirad - Tree Crops Department. Rubber Programme. Doras-Rubber Project : " Towards the improvement of the productivity of rubber tree ". Thai-French Joint Committee Programme. CP N° 1568.
- Clément-Demange, A. (2003). Doras-Rubber project. Towards the improvement of the productivity of rubber tree. Kasetsart University, Rrit-Doa, Cirad. Mission in Thailand, 1-14 June 2003. CP 1641-03, September 2003.
- Clément-Demange, A., Seguin, M., and Gohet, E. (2001). Déterminisme génétique et localisation de composantes physiologiques de la productivité de l'hévéaculture par approche QTL en Thaïlande. Réalisation d'une carte génétique ancrée sur marqueurs microsatellites. Acronyme: Genmap (Doras-Rubber). Proposition répondant au 2 ème appel à propositions (2001-2003) lancé par AGROPOLIS / Plate-forme de recherches avancées. 29 juin 2001.
- Prapan, K., Rodier-Goud, M., and Seguin, M. (2002). Genetic determinism and Qtl analysis of physiological components of Hevea productivity by genome mapping approach in Thailand: Genomemapping using microsatellite genetic markers. Doras-Rubber project, Rrit-Ku-Cirad. First term report, December 7, 2001 - February 28, 2002. Cirad-Montpellier.
- Prapan, K., Rodier-Goud, M., and Seguin, M. (2003). Genetic determinism and localization of physiological components of the productivity of teh heveaculture by Qtl approach in Thailand. Genetic mapping of Hevea brasiliensis using microsatellite markers. Doras-Rubber project, Rrit-Ku-Cirad. December , 2001 - November 2002. Cirad-Montpellier.
- Seguin, M. (2003). Doras-Rubber, Genmap component. Variability analysis and genetic determinism of some physiological characteristics of the productivity in Thailand. Development of a genetic map of RRIM600 x PB217 based on microsatellite markers. Update of the mapping work of Ms Kanlaya Prapan In Montpellier (Agropolis funding), July 2003.